

# Histomorfološka analiza tkiva bubrega u miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom Tff3

---

Firić, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:189679>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Martina Firić**

**HISTOMORFOLOŠKA ANALIZA TKIVA**  
**BUBREGA U MIŠEVA DIVLJEG TIPA I**  
**MIŠEVA S ISKLJUČENIM GENOM**  
***TFF3***

**Završni rad**

**Osijek, 2020.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**PREDDIPLOMSKI SVEUČLIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Martina Firić**

**HISTOMORFOLOŠKA ANALIZA TKIVA**  
**BUBREGA U MIŠEVA DIVLJEG TIP A I**  
**MIŠEVA S ISKLJUČENIM GENOM**  
***TFF3***

**Završni rad**

**Osijek, 2020.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Zavod za histologiju i embriologiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Nikola Bijelić

Rad ima 25 listova, 2 tablice i 3 slike.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Bubrežno tkivo.....	1
1.2. Obitelj TFF proteina .....	3
1.3. TFF3 protein u fiziološkim i patofiziološkim procesima .....	3
1.4. Uloga TFF3 proteina u mokraćnom sustavu .....	4
2. HIPOTEZA .....	5
3. CILJEVI .....	6
4. METODE .....	7
4.1. Ustroj studije.....	7
4.2. Materijal.....	7
4.3. Metode .....	7
4.4. Statističke metode.....	9
5. REZULTATI.....	10
6. RASPRAVA.....	15
7. ZAKLJUČAK .....	17
8. SAŽETAK.....	18
9. SUMMARY .....	19
10. LITERATURA.....	20
11. ŽIVOTOPIS .....	23

## 1. UVOD

### 1.1. Bubrežno tkivo

Bubrege, zajedno s mokraćovodom, mokraćnim mjehurom te mokraćnom cijevi, ubrajamo u mokraćni sustav. Mokraćni sustav sudjeluje u održavanju homeostaze, budući da uz pomoć filtracije, aktivne i pasivne apsorpcije i sekrecije stvara mokraću kojom se uklanjaju otpadni proizvodi organizma. U 24 sata nastaje oko 1500 mL mokraće. Osim što bubrezi reguliraju ravnotežu tjelesnih tekućina i elektrolita, izlučuju renin koji sudjeluje u održavanju krvnog tlaka te eritropoetin, čimbenik rasta eritrocita (1).

Svaki bubreg na konkavnoj, medijalnoj strani ima hilus kroz koji ulaze živci, ulaze i izlaze krvne limfne žile te izlazi mokraćovod, dok se na lateralnoj strani nalazi konveksna površina. Gornji dio mokraćovoda naziva se bubrežna nakapnica. Histološki se bubreg sastoji od kore i srži, dok je glavna funkcionalna jedinica bubrega nefron (u jednom bubregu ima ih između jednog i četiriju milijuna). Nefron se sastoji od bubrežnog tjelešca, proksimalnog zavijenog kanalića, tankog i debelog kraka Henleove petlje, distalnog zavijenog kanalića te sabirnih cjevčica i cijevi (1).

Bubrežno tjelešce, promjera oko 200  $\mu\text{m}$ , sastoji se od klupka krvnih kapilara, glomerula, okruženog dvostrukom ovojnicom nazvanom glomerularna (Bowmanova) čahura. Unutrašnji (visceralni) list čahure obavija kapilare glomerula, dok vanjski (parijetalni) list čini vanjsku granicu bubrežnog tjelešca, a ta dva lista omeđuju mokraćni, tj. interkapsularni, prostor u koji ulazi filtrat plazme glomerularnih kapilara sličan krvnoj plazmi, s tim da gotovo uopće ne sadrži bjelančevine (1).

Epitel parijetalnog lista čini jednoslojni pločasti epitel s bazalnom laminom i tankim slojem retikulinskih vlakana. Između endotelnih stanica kapilara glomerula i podocita, stanica unutrašnjeg lista, nalazi se bazalna membrana koja odjeljuje mokraćni prostor od krvi u kapilarama. Razlikuje se elektronski gusti sloj (*lamina densa*) sa svake strane omeđen svjetlijim slojem (*lamina rara*) (1).

Stanice kubičnog ili cilindričnog epitela proksimalnog zavijenog kanalića posjeduju brojne mikrovile koje čine četkastu prevlaku, dok između polazišta mikrovila pronalazimo pinocitotske mjehuriće koji sadrže makromolekule koje su prošle filtracijsku barijeru. Proksimalni kanalić apsorbira iz filtrata svu glukozu i aminokiseline te oko 85 % natrijeva klorida i vode te izlučuje kreatinin iz plazme u filtrat (tubularna sekrecija) (1).

Henleova petlja u obliku slova U sudjeluje u zadržavanju vode u organizmu, a sastoji se od tankog i debelog dijela silaznog kraka te tankog i debelog dijela uzlaznog kraka. Kortikalni nefroni imaju vrlo kratke tanke silazne dijelove i nemaju tankih uzlaznih dijelova, dok su jukstamedularni nefroni smješteni blizu kortikomedularne granice te su važni za stvaranje hipertonične mokraće (1).

Debeli krak Henleove petlje prelazi u koru i nastavlja se u distalni zavijeni kanalić, obložen kubičnim epitelom. Od proksimalnog kanalića razlikuje se po tome što ne sadrži četkastu prevlaku ni apikalne kanaliće, stanice su manje i imaju svjetliju citoplazmu. U distalnom se kanaliću vrši izmjena iona uz prisutnost aldosterona te se apsorbira natrij, a izlučuje kalij. Macula densa je promijenjeni odsječak stijenke distalnog kanalića u kojem se umjesto kubičnih stanica nalaze cilindrične, a stanice macule dense stvaraju signale koji pomažu pri oslobađanju renina u krvotok (1).

Jukstaglomerularne stanice, odnosno promijenjene glatke mišićne stanice tunike medije dovodne arteriole, izlučuju tvari koje sudjeluju u održavanju krvnog tlaka. Macula densa distalnog kanalića, dio dovodne arteriole koji sadržava jukstaglomerularne stanice i svijetlo obojene ekstaglomerularne mezangijske stanice (lacis stanice) čine jukstaglomerularni aparat. Jukstaglomerularne stanice izlučuju renin koji djeluje na angiotenzinogen te tako nastaje angiotenzin I, odnosno angiotenzin II (1).

Dalje mokraća ulazi u male sabirne cjevčice obložene kubičnim epitelom koji putem do srži prelazi u cilindrični epitel. Glavna je uloga odvodnih kanala u srži koncentriranje mokraće. Epitel sabirnih cijevi djeluje pod utjecajem arginin vazopresina ili antidiuretskog hormona. U slučaju manjka vode u organizmu izlučuje se antidiuretski hormon, a epitel sabirnih cijevi postaje propustan za vodu te se apsorbiranjem iz glomerularnog filtrata voda zadržava u organizmu (1).

Svaki bubreg dobiva krv iz bubrežne arterije. Njezini ogranci u hilusu stvaraju arterije koje se granaju. Od njih odlaze dovodne arteriole koje dovode krv u kapilare glomerula i obrnuto: iz njih krv odlazi u odvodne arteriole koje čine peritubularnu mrežu koja opskrbljuje krvlju proksimalni i distalni kanalić (1).

Intersticij bubrega zauzima malen volumen u kori, a veći u srži. To je prostor između mokraćnih kanalića te krvnih i limfnih žila. Hormoni, kao što je aldosteron, povećavaju

upijanje natrija iz filtrata u distalnom kanaliću i smanjuju gubitak natrija mokraćom te su bitni za održavanje ravnoteže elektrolita u tijelu (1).

## 1.2. Obitelj Tff proteina

U obitelj trefoil faktor proteina (engl. *Trefoil Factor Family*, Tff) ubrajamo male proteine Tff1, Tff2 i Tff3, a njihovi geni nalaze se na dugom kraku 21. kromosoma u genomskoj regiji 21.q22.3 (2, 3). Zbog smještaja gena te obitelji proteina istraživano je postoji li veza između navedenih proteina i Downovog sindroma, no takva veza nije uočena (4). U početku su se Tff proteini istraživali u probavnom sustavu jer ih luče vrčaste stanice sluznice probavne cijevi, a kasnije se utvrdilo da se nalaze i u drugim epitelnim stanicama koje luče mucine, kao npr. u respiracijskom epitelu, dijelovima žlijezda slinovnica, ali i u bubrežnim kanalićima te nekim neuronima središnjeg živčanog sustava (5,6). U probavnom sustavu Tff proteini utječu na viskoznost sluzi na površini sluznice, npr. Tff2 protein nakon intravenske primjene višestruko povećava viskoznost sluzi u želucu (7, 8). Također, Tff proteini pomažu u zaštiti i obnovi epitela ukoliko je došlo do ozljede sluznica. Tff1, Tff2 i Tff3 različito su izraženi u različitim tkivima: dok su Tff1 i Tff2 veoma izraženi u sluznici želuca, Tff3 je izražen slabo. Međutim, Tff3 protein veoma je izražen u vrčastim stanicama crijeva, za razliku od Tff1 i Tff2 koji su izraženi slabo ili uopće nisu prisutni (9). Kod zdravih ljudi sva tri proteina pronalaze se u serumu, slini, urinu, amnionskoj i sjemenoj tekućini te u sekretima cerviksa, dok je u serumu trudnica koncentracija navedenih triju proteina izrazito povišena (10).

## 1.3. Tff3 protein u fiziološkim i patološkim procesima

Tff3 protein prvenstveno nalazimo u tankom i debelom crijevu, a važan je za obnavljanje sluznica. Sukladno tome, nedostatak navedenog proteina izaziva otežano zacjeljivanje rana, kao i oštećenja na sluznicama tih dijelova probavne cijevi. Osim toga, Tff3 protein djeluje i na druge organe probavnog sustava, kao na primjer na želudac. Razina Tff3 proteina dobar je biomarker za praćenje raka želuca, štoviše, navodi se da je bolji od pepsinogenog testa. Kombinacijom testiranja serumskog pepsinogena i Tff3 proteina može se poboljšati probir na karcinom želuca i njegovu klasifikaciju u populaciji (11).

Tff3 protein nalazimo i u zdravoj gušterači, u Langerhansovim otočićima, a dokazano je da inzulin i glukagon utječu na razinu Tff3 proteina. Pacijenti s dijabetesom tipa I imaju



snižene vrijednosti Tff3 proteina u serumu, a terapija inzulinom smanjuje razinu glukoze u krvi te povećava razinu Tff3 proteina u serumu (12, 13).

Respiracijski epitel također sadržava Tff3 protein koji se luči u sluz, a povišene razine uočene su kod bolesnika s upaljenom sluznicom u alergijskim bolestima dišnog sustava, kao i kod onih koji boluju od karcinoma pluća (14, 15).

Povišene vrijednosti Tff3 proteina povezana su s lošom prognozom u pacijenata oboljelih od karcinoma dojke. Poticanjem njegove ekspresije olakšava se napredovanje i metastaziranje tumora dojke. Suprotno tomu, smanjivanjem ili blokiranjem njegove ekspresije dolazi do boljeg odgovora na terapiju te se rast tumora usporava. Slijedom navedenog, neki su istraživači zaključili da je Tff3 onkogen (16, 17).

Značajna ekspresija Tff3 proteina zabilježena je u hipokampusu, temporalnom korteksu i cerebelumu, dok prema nedavnim istraživanjima spomenuti protein olakšava učenje, prepoznavanje predmeta i zadržavanje pamćenja. Stoga se istražuje i njegova uloga u živčanom sustavu (18, 19).

Kad je riječ o mokraćnom sustavu, najveća je ekspresija Tff3 proteina u bubregu pa se pretpostavlja da Tff3 protein pomaže u procesu oporavka oštećenja epitela bubrežnih kanalića sve do starije životne dobi, u kojoj se njegova ekspresija smanjuje (20, 21). U istraživanjima je promatrana i povezanost između rizika od smrtnosti od karcinoma s povišenim razinama Tff3 u urinu. Patološka ekspresija uočena je u nekoliko karcinoma, uključujući karcinom endometrija i adenokarcinom prostate, rak želuca i nekoliko podtipova raka pluća (22).

#### **1.4. Uloga Tff3 proteina u mokraćnom sustavu**

U kulturi stanica bubrežnog karcinoma Tff3 proteini potiču invazivnost malignih stanica (23). Kronična bolest bubrega ima za posljedicu znatno povišenje razine Tff3 proteina u urinu i krvi. Novija istraživanja analize mokraćnih biomarkera, kao što su  $\alpha$ 1-mikroglobulini, KIM-1 i Tff3 protein, pokazala su da je razina Tff3 proteina snažno povezana sa smrtnošću od bubrežnih bolesti te da je razina Tff3 proteina u urinu viša kod osoba s dijabetesom, crne rase i osoba koje koriste antihipertenzivne lijekove (24, 25).

**2. HIPOTEZA**

Histomorfološka obilježja bubrega miševa s isključenim genom *Tff3* razlikuju se od miševa divljeg tipa.

### 3. CILJEVI

Ciljevi su ovog istraživanja:

- 1) usporediti površinu presjeka glomerula miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3*,
- 2) usporediti promjer kanalića kod miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* te
- 3) usporediti visinu epitela i promjer lumena kanalića miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3*.

### 4. MATERIJAL I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao presječna studija u kojoj su korišteni mišji bubrezi iz arhive Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Uzorci su uzeti u sklopu projekta MZOŠ „Uloga malih zaštitnih TFF proteina u zdravlju i bolesti“ (šifra 219-0982914-2179, voditeljica prof. dr. sc. Mirela Baus Lončar), koji je dobio odobrenje nadležnog etičkog povjerenstva. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/20-08/07).

#### 4.2. Materijal

Za istraživanje su korišteni bubrezi miševa divljeg tipa te miševa s isključenim *Tff3* genom starih šest mjeseci. Korišteni su uzorci pet životinja po skupini (ukupno deset miševa). Miševi su uzgojeni u vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku i žrtvovani u sklopu prethodno navedenog projekta te su uzorci organa fiksirani 4-postotnim paraformaldehidom, uklopljeni u parafin te pohranjeni u arhivu Zavoda.

#### 4.3. Metode

Fiksirani mišji bubrezi uklopljeni u parafinske blokove izrezani su na rotacijskom mikrotomu CUT 4060 marke Slee (Mainz, Njemačka). Rezovi su bili debljine 5-6  $\mu\text{m}$ . Nakon toga rezovi su nanoseni na predmetna stakalca i obojani metodom PAS (perjodna kiselina i Schiff-ov reagens, engl. *Periodic Acid Schiff reaction*), nakon čega su analizirani na temelju histomorfološke građe i parametara.

#### Protokol PAS metode bojenja

##### Otopine za bojenje metodom PAS:

1. 0,5 %-tna vodena otopina perjodne kiseline

- a) otopiti 0,5 g perjodne kiseline u 100 mL destilirane vode.

#### 2. Schiff-ov reagens:

- a) otopiti 1,0 g bazičnog fuksina (pararosalina) u 200 mL vruće destilirane vode,
- b) ohladiti na 50 °C i dodati 20 ml u 36,5 g HCl (hladiti dalje i dodati 1 g Na-metabisulfita),
- c) spremi u hladnjak na tamno mjesto na 48 sati, dok otopina ne dobije žuto-slamnatu boju,
- d) dodati 5 g aktivnog drvenog ugljena, miješati i filtrirati nekoliko puta dok otopina ne bude bistra.

- bistri filtrat je Schiff-ov reagens

- čuvati u tamnoj boci u hladnjaku

#### Postupak bojenja metodom PAS:

1. Deparafinirati rezove te ih provesti kroz alkohole do destilirane vode,
2. Postaviti ih u 0.5 %-tnu vodenu otopinu perjodne kiseline - 5 min,
3. Dobro isprati nekoliko puta u destiliranoj vodi,
4. Postaviti ih u Schiff-ov reagens - 15 minuta,
5. Isprati u tekućoj, mlakoj vodi - 5-10 minuta,
6. Bojiti jezgre Mayer-ovim haematoksilinom,
7. Isprati u tekućoj vodi,
8. Uroniti u apsolutni alkohol Xylol i staviti Canada balsam.

Digitalne fotografije kore i srži mišjih bubrega fotografirane su digitalnim fotoaparatom marke Olympus® (model C-5050) (Olympus, Tokyo, Japan), spojenim na mikroskop marke Olympus® (model BX-50) uz pomoć računalnog programa QuickPHOTO Pro (Promicra s.r.o, Prag, Republika Češka). Fotografije preparata obojenih PAS metodom obrađene su uz pomoć računalnog programa FIJI (FIJI is Just ImageJ) (26). Uz pomoć

navedenog programa izmjereni su površina presjeka glomerula, promjer proksimalnih, distalnih i sabirnih kanalića, visina epitela te širina lumena kanalića.

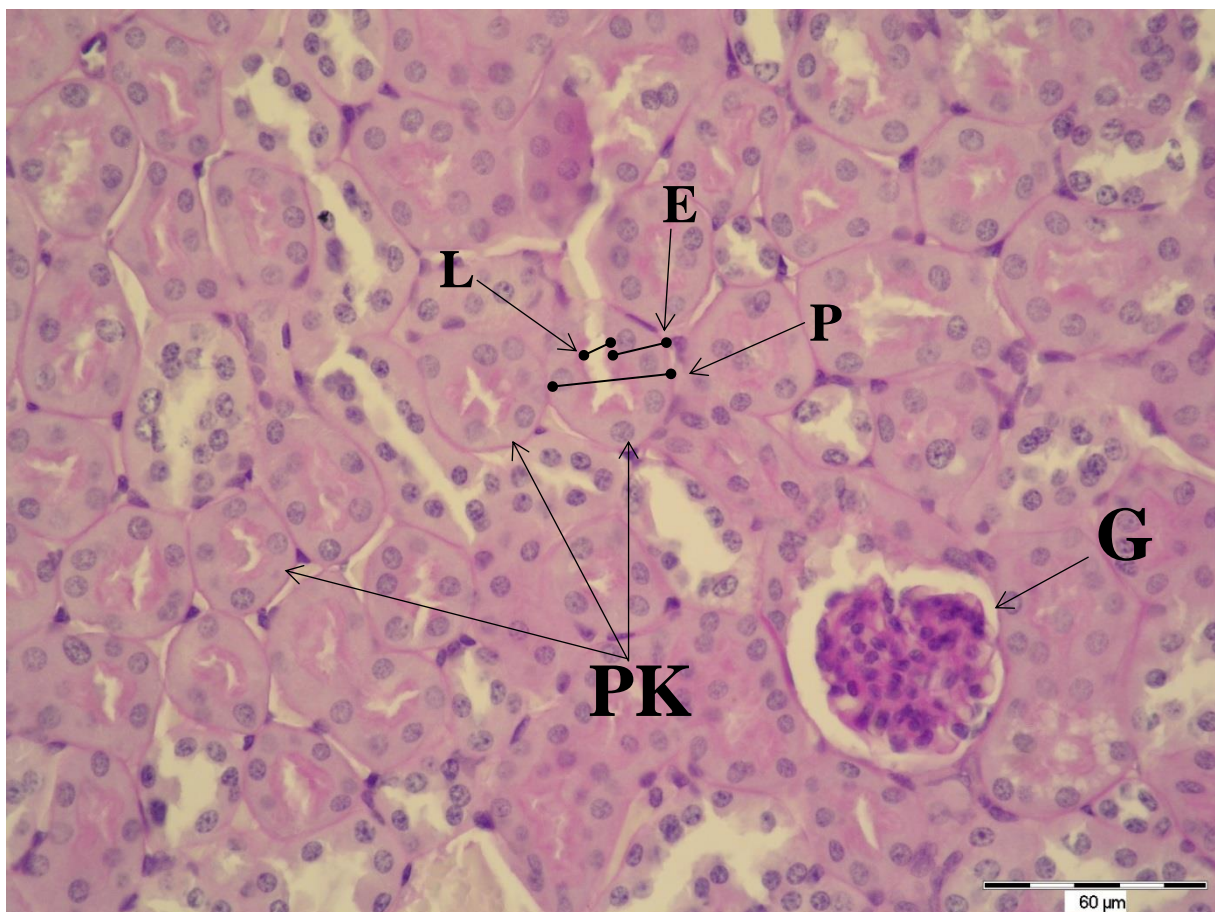
Od svakog preparata fotografirano je pet fotografija kore bubrega te tri fotografije srži bubrega. Iznimka je jedna životinja kojoj nije bilo moguće fotografirati srž zbog nekakve tvorevine na njezinu uzorku. Na svakoj fotografiji izvršena su mjerenja zadanih struktura te je iz tih vrijednosti za svaki uzorak izračunata aritmetička sredina za svaku izmjerenu strukturu kako bi se dobile prosječne vrijednosti koje su korištene u statističkoj analizi.

### 4.4. Statističke metode

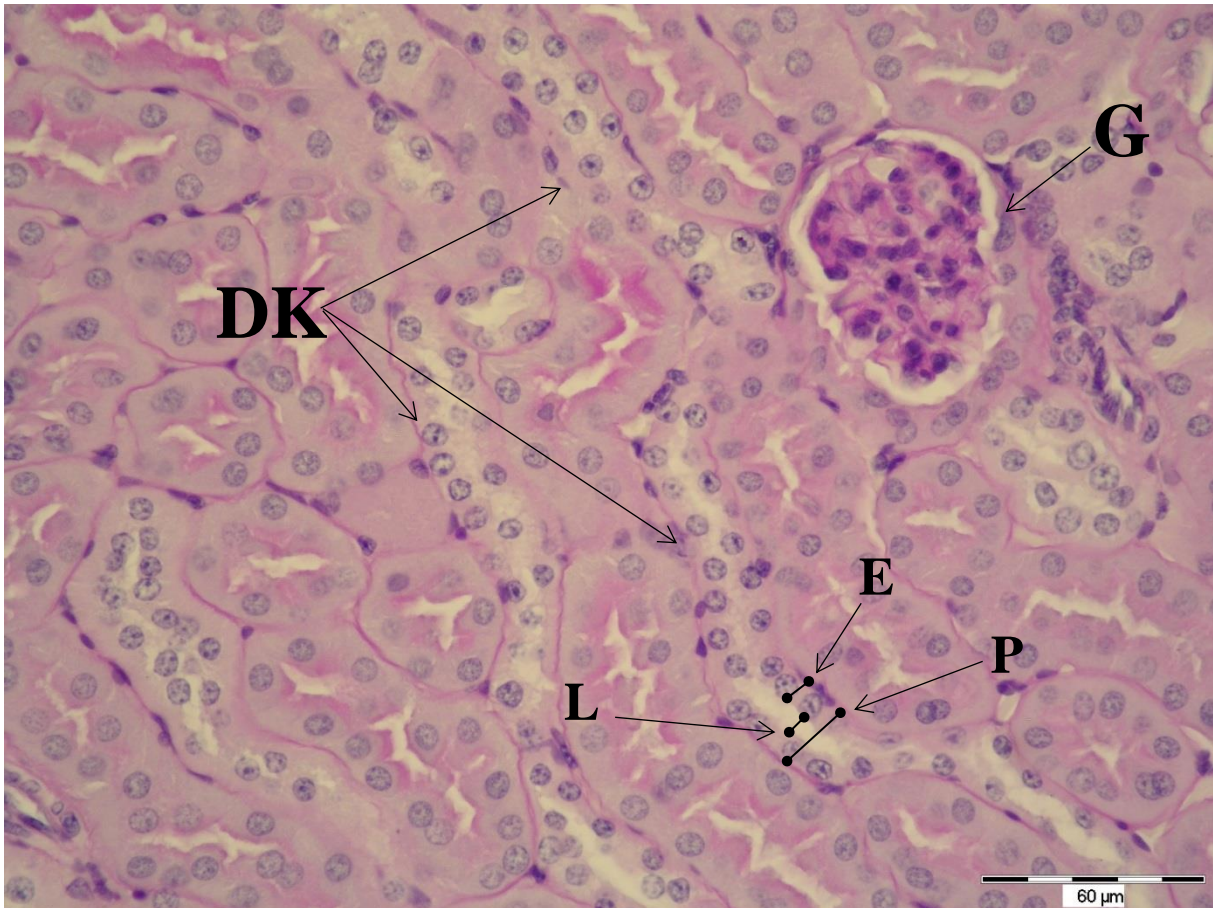
Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike između skupina testirane su Mann-Whitney U testom za nezavisne uzorke. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha=0,05$ . Sve su P-vrijednosti dvostrane. Za statističku analizu korišten je program MedCalc Statistical Software, verzija 19.2.6. (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020).

## 5. REZULTATI

U svrhu izrade ovog rada korišteno je pet uzoraka bubrega miševa s isključenim *Tff3* genom i pet uzoraka bubrega miševa divljeg tipa. Uspoređivani su površina presjeka glomerula, promjer kanalića, visina epitela i promjer lumena kanalića u objema skupinama uzoraka. Bojenjem metodom PAS ugljikohidrati su se obojili ljubičastom, citoplazma raznim oblicima ružičaste, a jezgra plavom bojom. Morfološkim pregledom preparata nisu uočene veće razlike u građi glomerula niti kanalića kore i srži između ispitivanih skupina. Pronađeno je normalno tkivo kore i srži bubrega. Slike 1 i 2 prikazuju preparate kore bubrega, a Slika 3 preparat srži bubrega. Na slikama su označene strukture mjerene u ovom istraživanju.

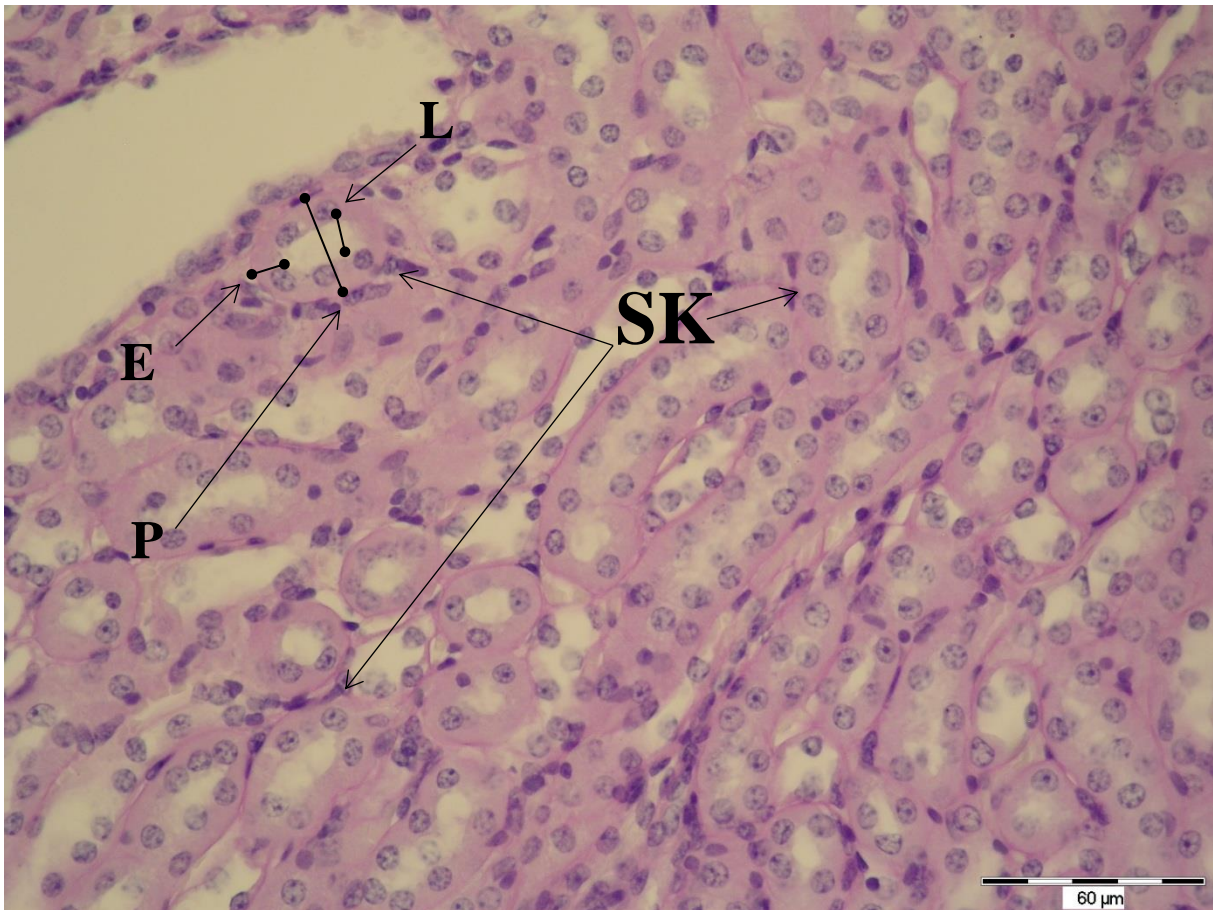


Slika 1. Kora bubrega miša divljeg tipa u kojoj se vidi glomerul (G) kojemu su izmjereni površina i proksimalni kanalići (PK), a u kojima su mjereni promjer (P), visina epitela (E) i širina lumena (L). Mjerilo: 60 µm (fotografirala autorica).



Slika 2. Kora bubrega miša s isključenim *Tff3* genom u kojoj se vidi glomerul (G) kojemu su izmjereni površina i distalni kanalići (DK), a njima promjer (P), visina epitela (E) i širina lumena (L); mjerilo: 60 µm (fotografirala autorica).





Slika 3. Srž bubrega miša s isključenim *Tff3* genom u kojoj se vidi sabirni kanalić (SK) u kojem su izmjereni promjer (P), visina epitela (E) te širina lumena (L); mjerilo: 60 µm (fotografirala autorica).

U Tablici 1 i 2 prikazani su rezultati mjerenja zadanih struktura u kori, odnosno srži bubrega, kori i srži miševa divljeg tipa te miševa s isključenim *Tff3* genom (u obliku medijana i interkvartilnog raspona).

Tablica 1. Rezultati mjerenja u kori u miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3*

<b><u>KORA</u></b>	<b>Medijan (interkvartilni raspon)</b>		<b><i>P</i>*</b>
<b>Mjerena vrijednost</b>	<b>Miševi divljeg tipa</b>	<b>Miševi s isključenim genom <i>Tff3</i></b>	
Površina glomerula ( $\mu\text{m}^2$ )	3331,56 (2100,30 - 5255,77)	3779,67 (2609,91 - 3992,60)	$P > 0,95$
Promjer proksimalnog kanalića ( $\mu\text{m}$ )	29,75 (29,42 - 35,22)	39,32 (37,23 - 40,15)	<b><math>P = 0,03</math></b>
Visina epitela proksimalnog kanalića ( $\mu\text{m}$ )	12,20 (11,23 - 13,70)	13,77 (13,27 - 15,1)	$P = 0,15$
Širina lumena proksimalnog kanalića ( $\mu\text{m}$ )	3,95 (3,67 - 4,24)	5,35 (4,31 - 6,43)	<b><math>P = 0,03</math></b>
Promjer distalnog kanalića ( $\mu\text{m}$ )	26,73 (25,03 - 29,49)	25,63 (23,27 - 28,95)	$P = 0,84$
Visina epitela distalnog kanalića ( $\mu\text{m}$ )	10,41 (9,17 - 10,60)	10,33 (9,12 - 11,07)	$P > 0,95$
Širina lumena distalnog kanalića ( $\mu\text{m}$ )	6,28 (4,64 - 7,17)	5,41 (5,21 - 7,20)	$P > 0,95$
*Mann-Whitney U test			

Vrijednosti promjera proksimalnog kanalića te širine njegova lumena značajno su se razlikovale, s tim da su miševi s isključenim *Tff3* genom imali veći promjer proksimalnog kanalića i širinu lumena nego miševi divljeg tipa. Za vrijednosti površine glomerula, visine epitela proksimalnog kanalića, promjera, visine epitela i širine lumena distalnog kanalića nije uočena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina.

Tablica 2. Vrijednosti izmjerenih parametara u srži u miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* zaokružene na dvije decimale

<b><u>SRŽ</u></b>	<b>Medijan (interkvartilni raspon)</b>		<b><i>P</i>*</b>
<b>Mjerena vrijednost</b>	<b>Miševi divljeg tipa</b>	<b>Miševi s isključenim genom <i>Tff3</i></b>	
Promjer sabirnog kanalića (μm)	26,02 (23,88 - 27,77)	24,09 (23,65 - 25,03)	<i>P</i> = 0,29
Visina epitela sabirnog kanalića (μm)	8,38 (7,48 - 9,23)	8,46 (7,48 - 8,79)	<i>P</i> = 0,73
Širina lumena sabirnog kanalića (μm)	8,31 (7,93 - 9,60)	7,93 (7,36 - 8,63)	<i>P</i> = 0,56
*Mann-Whitney U test			

Nije uočena statistički značajna razlika promjera sabirnog kanalića, visine njegova epitela te širine lumena između ispitivanih skupina.

## 6. RASPRAVA

Svrha ovoga istraživanja bila je usporediti histomorfološku građu bubrega miševa s isključenim *Tff3* genom i miševa divljeg tipa te ispitati postoje li razlike između ispitivanih skupina. Iako su do sad poznate uloge Tff proteina u mokraćnom sustavu potaknule brojna istraživanja u tom području, do sada nije istraživani utjecaj nedostatka Tff3 proteina na histomorfologiju bubrega. S obzirom da je od cijele obitelji Tff proteina Tff3 protein najviše izražen u bubregu i bubrežnim kanalićima, osobito u proksimalnim i distalnim kanalićima te sabirnim cjevčicama kore, za ovo istraživanje odabrani su miševi kojima je isključen gen za taj protein. (20, 21).

U ovom istraživanju uočena je statistički značajna razlika u rezultatima mjerenja dviju od deset mjerenih struktura – promjer proksimalnog kanalića te širina lumena proksimalnog kanalića. Obje vrijednosti bile su povećane u miševa s isključenim genom *Tff3*. Također, visina epitela proksimalnog kanalića bila je viša u toj skupini, iako ne statistički značajno. Ukupno gledano, sve mjere proksimalnog zavijenog kanalića bile su povećane u miševa s isključenim genom *Tff3*. U tom kontekstu zanimljivo je da je upravo proksimalni kanalić jedno od glavnih mjesta ekspresije Tff3 proteina u bubregu.

Neka patološka stanja i bolesti uzrokuju hipertrofiju određenih dijelova nefrona bubrega. Na primjer, u jednom istraživanju zabilježeni su povećani glomeruli, prošireni mokraćni prostor, povećana površina presjeka proksimalnog zavijenog kanalića te njegovog lumena u pretilih bolesnika s proteinurijom, a autori smatraju da su te promjene uključene u patogenezu bubrežne bolesti povezane s pretilošću (27). Opisana je povezanost Tff3 proteina i metabolizma glukoze, a u životinjskih modela pretilosti smanjena je ekspresija *Tff3* gena u jetri (28). Ipak, ostaje otvoreno pitanje ima li nedostatak Tff3 proteina u bubrežnom tkivu neki izravan učinak na metabolizam koji bi mogao imati za posljedicu povećanje proksimalnog kanalića.

Hipertrofija bubrežnog tkiva može biti posljedica bolesti ili kirurškog zahvata koji rezultira smanjenjem količine bubrežnog tkiva. (29). Povećani promjeri proksimalnih kanalića miševa s isključenim *Tff3* genom mogli bi ukazivati na hipertrofiju tkiva. Kako bi potvrdili ili opovrgnuli tu pretpostavku, potrebna su daljnja istraživanja na bubrezima miševa s isključenim genom *Tff3*, koja bi mogla uključivati vaganje bubrega, mjerenje ukupnog volumena bubrega i detaljnu morfometrijsku analizu koja bi obuhvatila i udio površine

pojedinih struktura (npr. proksimalnih kanalića) na presjeku tkiva. Istraživanje bi trebalo provesti i na miševima različite starosti, budući da se takve promjene na bubrežima često mijenjaju s vremenom. Isto tako, bilo bi korisno provesti pokuse koji bi ispitali utjecaj povećanog opterećenja bubrega tekućinom ili izazivanja hipertrofije farmakološkim putem, npr. furosemidom u miševa s isključenim genom *Tff3* (29).

Tff proteini sudjeluju u zacjeljivanju sluznica i koriste se kao biomarkeri u praćenju raznih bolesti, pa tako i mokraćnog sustava. Na primjer, Tff2 i Tff3 proteini dobri su prognostički markeri nekih upalnih stanja mokraćnog sustava. (9, 20). Povišena razina Tff3 proteina u tkivu, serumu ili urinu povezana je s obilježjima i tijekom raznih malignih bolesti (17, 22). Stoga bi se mogao ispitati i utjecaj nedostatka Tff3 proteina na morfologiju i funkciju bubrega pomoću životinjskih modela bubrežnih bolesti, uključujući tumore.

Isključivanje *Tff3* gena ne dovodi do velikih promjena histomorfologije bubrega u inače zdravih miševa, međutim, rezultati koje smo zabilježili na proksimalnim kanalićima svakako su dobra polazišna točka za daljnja istraživanja u skladu s gore navedenim prijedlozima.

## 7. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem dolazimo do sljedećih zaključaka:

- 1) površina presjeka glomerula miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* ne razlikuje se značajno,
- 2) promjer proksimalnih kanalića kod miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* značajno se razlikuju, dok se promjer distalnih i sabirnih kanalića ne razlikuju značajno,
- 3) promjer lumena proksimalnih kanalića kod miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* značajno se razlikuju, dok se visina epitela proksimalnih, distalnih i sabirnih kanalića te promjer lumena distalnih i sabirnih kanalića ne razlikuju značajno.

**8. SAŽETAK**

**CILJEVI ISTRAŽIVANJA.** Ciljevi ovog istraživanja bili su uspoređivanje površine presjeka glomerula, kao i uspoređivanje promjera kanalića, visine epitela i promjera lumena kanalića kod miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3* te ispitivanje postojanja razlika u navedenim parametrima između tih dviju skupina miševa.

**USTROJ STUDIJE.** Istraživanje je provedeno kao presječna studija u kojoj su korišteni uzorci mišjih bubrega iz arhive Zavoda za histologiju i embriologiju.

**MATERIJAL I METODE.** Za istraživanje su korišteni bubrezi miševa divljeg tipa te miševa s isključenim *Tff3* genom. Korišteni su uzorci pet životinja po skupini (ukupno deset miševa). Preparati su obojeni metodom PAS (Perjodna kiselina i Schiff-ov reagens), nakon čega su analizirani na osnovi histomorfološke građe i parametara. Mjerenja parametara izvršena su pomoću programa FIJI na pet fotografija kore i trima fotografijama srži za pojedinu životinju.

**REZULTATI.** Miševi s isključenim *Tff3* genom imali su veći promjer proksimalnog kanalića i širinu njegova lumena nego miševi divljeg tipa. Analizom ostalih vrijednosti nije uočena značajna razlika mjerenih vrijednosti u kori i srži bubrega.

**ZAKLJUČAK.** Postoje značajne razlike u promjeru proksimalnih kanalića te širini lumena proksimalnih kanalića kod miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Tff3*, za razliku od površine presjeka glomerula, promjera distalnih i sabirnih kanalića te visine epitela i širine lumena proksimalnih, distalnih te sabirnih kanalića.

**KLJUČNE RIJEČI:** bubreg; bubrežni kanalići; glomerul; histologija; Tff3 protein

## 9. SUMMARY

### **HISTOMORPHOLOGICAL ANALYSIS OF KIDNEY TISSUE OF WILD-TYPE AND TFF3 KNOCK-OUT MICE**

**OBJECTIVES:** The objectives of this study were to compare the cross-sectional area of the glomeruli as well to compare tubular diameter, epithelial height and tubular lumen diameter in wild-type mice and Tff3 knock-out mice and to examine whether there are differences in these parameters between the two groups of mice.

**STUDY DESIGN:** The study was done as a cross-sectional study using samples of mice kidneys from the archives of the Department for Histology and Embryology.

**MATERIAL AND METHODS:** Five samples of mice kidneys of wild type and five samples of Tff3 knock-out mice were used for this research (ten mice in total). The kidney slides were stained by PAS (Periodic Acid Schiff reaction) after which they were analyzed on the basis of histomorphological structure and parameters. Parameter measurements were performed using the FIJI program on five photographs of cortex and three photographs of the marrow for each animal.

**RESULTS:** Tff3 knock-out mice had a larger proximal tubule diameter and lumen width than wild-type mice. The analysis of other values did not show a significant difference between the measured values in the cortex and marrow of the kidney.

**CONCLUSION:** There are significant differences in the diameter of the proximal tubules and the width of the lumen of the proximal tubules in wild-type mice and Tff3 knock-out mice, unlike to the glomerular cross-sectional area, distal and collecting duct diameter, epithelial height and lumen width of proximal, distal and collecting ducts.

**KEYWORDS:** kidney; renal tubules; glomerulus; histology; Tff3 protein



**10. LITERATURA**

1. Junqueira LC, Camerio J. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 1995.
2. Regalo G, Wright NA, Machado JC. Trefoil factors: from ulceration to neoplasia. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2005;62(24):2910–5.
3. Gött P, Beck S, Machado JC, Carneiro F, Schmitt H, Blin N. Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur J Hum Genet EJHG*. 1996;4(6):308–15.
4. Cheon MS, Shim KS, Kim SH, Hara A, Lubec G. Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down syndrome brain: Challenging the gene dosage effect hypothesis *Amino Acids*. 2003; 25(1):41-7.
5. Dos Santos Silva E, Ulrich M, Döring G, Botzenhart K, Gött P. Trefoil factor family domain peptides in the human respiratory tract. *J Pathol*. 2000;190(2):133–42
6. Hoffmann W, Jagla W, Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol*. 2001; 16(1):319–34.
7. Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest*. 2002;32(7):519–27.
8. Kjellek S, NexU00F8 E, Thim L, Poulsen S. Systemically administered trefoil factors are secreted into the gastric lumen and increase the viscosity of gastric contents. *Br J Pharmacol*. 2006;149(1):92–9
9. Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue Localization of Human Trefoil Factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem*. 2007;55:505–13.
10. Samson MH. Quantitative measurements of trefoil factor family peptides: possibilities and pitfalls. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013;73(3):193–202.
11. Huang Z, Zhang X, Lu H, Wu L, Wang D, Zhang Q, et al. Serum trefoil factor 3 is a promising non-invasive biomarker for gastric cancer screening: a monocentric cohort study in China. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:74.

12. Guppy NJ, El-Bahrawy ME, Kocher HM, Fritsch K, Qureshi YA, Poulsom R, et al. Trefoil factor family peptides in normal and diseased human pancreas. *Pancreas*. 2012;41(6):888–96.
13. Roa GJB, Tortolero GS, Gonzalez JE. Trefoil factor 3 (TFF3) expression is regulated by insulin and glucose. *J Health Sci*. 2013;3(1):1–12.
14. Miyahara N, Ishino T, Kono T, Go K, Takeno S, Takumida M, et al. Expression of Trefoil factor family peptides in the nasal allergic mucosa. *Rhinology*. 2012;50(4):408–16.
15. Qu Y, Yang Y, Ma D, Xiao W. Increased trefoil factor 3 levels in the serum of patients with three major histological subtypes of lung cancer. *Oncol Rep*. 2012;27(4):1277–83.
16. Pandey V, Wu Z-S, Zhang M, Li R, Zhang J, Zhu T, et al. Trefoil factor 3 promotes metastatic seeding and predicts poor survival outcome of patients with mammary carcinoma. *Breast Cancer Res BCR*. 2014;16(5):429.76.
17. Kannan N, Kang J, Kong X, Tang J, Perry JK, Mohankumar KM, et al. Trefoil factor 3 is oncogenic and mediates anti-estrogen resistance in human mammary carcinoma. *Neoplasia N Y N*. 2010;12(12):1041–53.
18. Hirota M, Awatsuji H, Sugihara Y, Miyashita S, Furukawa Y, Hayashi K. Expression of pS2 gene in rat brain. *Biochem Mol Biol Int*. 1995;35(5):1079–84.
19. Shi H-S, Yin X, Song L, Guo Q-J, Luo X-H. Neuropeptide Trefoil factor 3 improves learning and retention of novel object recognition memory in mice. *Behav Brain Res*. 2012;227(1):265–9.
20. Rinnert M, Hinz M, Buhtz P, Reiher F, Lessel W, Hoffmann W. Synthesis and localization of trefoil factor family (TFF) peptides in the human urinary tract and TFF2 excretion into the urine. *Cell Tissue Res*. 2010;339(3):639–47.
21. Debata PR, Panda H, Supakar PC. Altered expression of trefoil factor 3 and cathepsin L gene in rat kidney during aging. *Biogerontology*. 2007;8(1):25–30.
22. O’Seaghdha CM, Hwang S-J, Larson MG, Meigs JB, Vasan RS, Fox CS. Analysis of a urinary biomarker panel for incident kidney disease and clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2013;24(11):1880–8.

23. Rodrigues S, Attoub S, Nguyen Q-D, Bruyneel E, Rodrigue CM, Westley BR, et al. Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmolytic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene*. 2003;22(29):4488–97.
24. Astor BC, Köttgen A, Hwang S-J, Bhavsar N, Fox CS, Coresh J. Trefoil factor 3 predicts incident chronic kidney disease: a case-control study nested within the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am J Nephrol*. 2011;34(4):291–7.
25. Du T, Luo H, Qin H, Wang F, Wang Q, Xiang Y, et al. Circulating serum trefoil factor 3 (TFF3) is dramatically increased in chronic kidney disease. *PloS One*. 2013;8(11):e80271.
26. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676–82.
27. Tobar A, Ori Y, Benchetrit S, Milo G, Herman-Eldelstein M, Zingerman B et al. Proximal Tubular Hypertrophy and Enlarged Glomerular and Proximal Tubular Urinary Space in Obese Subjects with Proteinuria. *PloS One*. 2013;8(9): e75547.
28. Šešelja, K, Bazina, I, Welss, J, Schicht, M, Paulsen, F, Bijelić, N, et al. Effect of Tff3 Deficiency and ER Stress in the Liver. *Int. J Mol Sci*. 2019, 20(18), 4389; <https://doi.org/10.3390/ijms20184389>
29. Kobayashi S, Clemmons DR, Nogami H, Roy AK, Venkatachalam MA. Tubular hypertrophy due to work load induced by furosemide is associated with increases of IGF-1 and IGFBP-1. *Kidney International*. 1995, 47:818-28.

## 11. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Martina Firić

Datum i mjesto rođenja: 2. rujna 1998., Osijek

Kućna adresa: Dubrovačka ulica 1F, 31000 Osijek

Tel.: +385911897706

E-mail: [martina.firic@gmail.com](mailto:martina.firic@gmail.com)

### OBRAZOVANJE:

2005. – 2013. Osnovna škola Svete Ane u Osijeku

2013. – 2017. II. gimnazija Osijek u Osijeku

2017. – 2020. Medicinski fakultet u Osijeku, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

### OSTALE AKTIVNOSTI:

2007. – 2013. – treniranje ritmičke gimnastike

2010. – 2013. – treniranje gimnastike

2015. – 2017. – sudjelovanje u projektu Erasmus+ Znanjem do razvoja (II. gimnazija Osijek)

2017. – stjecanje DSD-diplome (njemački jezik)

2019. – zamjenica predstavnice 4. godine MLD-a u Studentskom zboru Medicinskog fakulteta u Osijeku